

Bước đầu nghiên cứu đa hình nucleotide đơn *MC4R*-rs17782313 ở trẻ 5-6 tuổi Hà Nội bằng phương pháp PCR-RFLP

Lê Thị Tuyết¹, Trần Quang Bình^{2,*}

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, 136 Xuân Thủy, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương, 1 Yéc Xanh, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 22 tháng 5 năm 2015

Chỉnh sửa ngày 29 tháng 5 năm 2015; Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 8 năm 2015

Tóm tắt: Gen *MC4R* (melanocortin 4 receptor) có vai trò quan trọng trong điều hòa ăn uống và trao đổi chất ở người. Đa hình nucleotide đơn (SNP) rs17782313 nằm phía sau gen *MC4R* 188 kp có ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen này. Các nghiên cứu di truyền cho thấy alen C của SNP rs17782313 liên quan đến nhiều bệnh tật ở người như béo phì, đái tháo đường. Mục tiêu của nghiên cứu là ứng dụng phương pháp PCR-RFLP để xác định kiểu gen SNP rs17782313 ở 138 trẻ 5-6 tuổi tại Hà Nội (69 trẻ có tình trạng dinh dưỡng bình thường và 69 trẻ béo phì). Kết quả thu được là đã thiết kế được quy trình PCR-RFLP để xác định kiểu gen của SNP rs17782313 với cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR gồm: mồi xuôi 5'-ctagtctctctccacatgc-3' và mồi ngược 5'-ctttctgtcatttcctc-3'; enzyme cắt giới hạn *AvaI* được lựa chọn để phân biệt alen C hay T. Tỷ lệ kiểu gen ở nhóm trẻ bình thường là: CC (4,3%), CT (13,1%), TT (82,6%) ($P_{HWE}=0,023$), ở nhóm trẻ béo phì là: CC (1,4%), CT (13,1%), TT (85,5%) ($P_{HWE}=0,416$).

Từ khóa: *MC4R* rs17782313, PCR-RFLP, trẻ em, xác định kiểu gen.

1. Mở đầu

Thụ thể melanocortin 4 (melanocortin 4 receptor, *MC4R*) là thụ thể của hormone α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone) trên màng tế bào, được mã hóa bởi gen *MC4R* [1]. Các nghiên cứu trên chuột cho thấy *MC4R* có vai trò quan trọng trong điều hòa ăn uống, trao đổi chất và hành vi sinh dục [2, 3]. Năm 1998, lần đầu tiên đột biến của gen *MC4R* được báo

cáo có liên quan đến béo phì di truyền ở người [4]. Thiếu hụt protein *MC4R* do sự mất một hoặc cả hai alen *MC4R* là hình thức phổ biến nhất trong các đột biến gây bệnh béo phì, ảnh hưởng đến 4% dân số béo phì nặng ở Pháp và xấp xỉ 6% ở Anh. Trẻ em mang đột biến *MC4R* biểu hiện béo phì sớm và nghiêm trọng, xuất hiện hành vi tìm thức ăn từ 6 tháng tuổi, tăng khối lượng mỡ, tăng insulin; so với trẻ cùng tuổi, những trẻ này có tầm vóc cao hơn, tốc độ phát triển mạnh hơn, và tuổi xương già hơn (vượt quá thời gian từ 1-5 năm) so với trẻ bình thường [5].

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-904470844.
Email: binhqt@nihe.org.vn

Đa hình nucleotide đơn (single nucleotide polymorphism, SNP) rs17782313 nằm ở vị trí phía sau gen *MC4R* 188 kb, có vai trò trong điều hòa biểu hiện gen *MC4R* [1]. Các nghiên cứu GWAS (genome wide association study) cho thấy SNP rs17782313 gồm hai alen C và T - là những biến thể phổ biến và liên quan mạnh đến BMI, bệnh béo phì, đái tháo đường, rối loạn lipid máu ở cả người lớn, trẻ em. Những người mang alen C có nguy cơ bị béo phì, đái tháo đường cao hơn những người mang alen T; tuy nhiên, mức độ liên quan này lại không giống nhau ở các quần thể khác nhau có thể do đặc điểm di truyền chủng tộc và đặc điểm môi trường sống khác nhau ở mỗi quốc gia [6-9]. Do đó, rất cần nghiên cứu về ảnh hưởng của SNP rs17782313 đối với nguy cơ mắc một số bệnh như béo phì, rối loạn chuyển hóa, đái tháo đường trên quần thể người Việt Nam.

Các phương pháp phân tử hiện đại như real-time PCR, giải trình tự gen, ADN chip đã được ứng dụng thành công trong việc xác định các kiểu gen gây bệnh ở người [6, 9]. Tuy nhiên, trong điều kiện Việt Nam việc ứng dụng các phương pháp trên gặp nhiều khó khăn do sự hạn chế về trang thiết bị và giá thành cao của hóa chất, sinh phẩm. Phương pháp PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) dựa trên nguyên lý là sản phẩm ADN mang SNP được tạo ra từ phản ứng PCR sẽ được cắt thành các đoạn ngắn bởi enzyme cắt giới hạn, và độ dài của các đoạn này sẽ được nhận biết qua hình ảnh điện di. Hai alen của SNP sẽ được nhận biết bởi sự có mặt hoặc không có mặt của vị trí cắt giới hạn. Phương pháp RFLP chỉ cần những trang thiết bị cơ bản như máy PCR, máy điện di và máy chụp gel, và đã được áp dụng để xác định các kiểu gen ở quần thể người Việt Nam [10]. Tuy nhiên, hiện nay chưa có công bố trong nước nào báo cáo về việc áp dụng phương pháp này để xác định kiểu

gen của SNP rs17782313 trên đối tượng người Việt Nam. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là áp dụng phương pháp PCR-RFLP để xác định đa hình nucleotide đơn *MC4R*-rs17782313 ở trẻ 5-6 tuổi Hà Nội.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 138 trẻ 5-6 tuổi có tình trạng dinh dưỡng bình thường và bị béo phì được lấy ngẫu nhiên từ đề tài mã số: 01C-08/05-2011-2. Tiêu chuẩn xác định tình trạng dinh dưỡng trẻ là trẻ phải có tình trạng dinh dưỡng bình thường hoặc béo phì thỏa mãn cả hai tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới (World Health Organization) năm 2007 (WHO 2007) và Tổ chức hành động vì béo phì quốc tế (The International Obesity Task Force) năm 2000 (IOTF 2000).

2.2. Vật liệu

Mẫu ADN: ADN được tách từ tế bào bạch cầu sử dụng kit Wizard genomic DNA purification (Promega Cat. #A1125, USA). Tất cả các mẫu ADN đều có tỉ số A260/A280 từ 1,8 đến 2, đảm bảo độ tinh sạch cho nghiên cứu.

Hóa chất, sinh phẩm: môi đặc hiệu nồng độ 10 pmol/μl (Invitrogen, USA), PCR master mix 2x (Fermentas) (0,05 u/μl taq DNA polymerase, 4 mM MgCl₂, dNTP 400 μM, enzyme cắt giới hạn FastDigest® *AvaI* (*Eco88I*) (Fermentas), gel agarose (Promega, Spain), đệm Ultrapure™ 10x TBE (Invitrogen), chất nhuộm màu RedSafe™ (Intron Biotechnology), và thang marker ΦX174 DNA *HaeIII* Digest (BioLabs).

Trang thiết bị: máy PCR (Eppendorf), máy điện di Mupid Exu (Japan), máy ủ nhiệt, tủ lạnh, máy ly tâm, máy chụp ảnh bản gel Geldoc-It™.

2.3. Phương pháp

- *Phương pháp xác định enzyme cắt giới hạn và trình tự môi cho phản ứng PCR:* Cần chọn một enzyme cắt giới hạn để nhận biết alen C hoặc T của SNP rs17782313 và thiết kế cặp môi cho phản ứng PCR. Các bước xác định enzyme cắt giới hạn tối ưu và thiết kế môi cho rs17782313 sử dụng cho phương pháp RFLP như sau: đầu tiên là xác định trình tự nucleotide trước và sau SNP rs17782313 trên cơ sở dữ liệu NCBI [11]; tiếp theo là xác định môi mismatch và enzyme cắt giới hạn mismatch dựa trên cơ sở dữ liệu helix [12] và thermoscientificbio [13]; trình tự môi thứ hai được thiết kế bằng cách sử dụng phần mềm Using Oligo 7 Primer Analysis [14] và UCSC In-Silico PCR online [15]; cuối cùng là kiểm tra trình tự của sản phẩm PCR trên cơ sở dữ liệu genome [15] và chiều dài các đoạn ADN được cắt bởi enzyme giới hạn được xác định trên cơ sở dữ liệu restriction mapper [16].

- *Phương pháp xác định nhiệt độ gắn môi tối ưu cho phản ứng PCR:* Nhiệt độ tan (melting temperature) của hai môi cho phản ứng PCR đã được thiết kế theo phương pháp trên là khoảng 52°C - 54°C [14, 15]. Sử dụng phương pháp PCR gradient để xác định nhiệt độ gắn môi (annealing temperature, Ta) với dãy nhiệt độ thử nghiệm là: 50 °C, 52 °C, 54 °C và 56°C. Thành phần cho phản ứng PCR với tổng thể tích 15 µl gồm: 3,0 µl nước tinh khiết (không có ADN); 10,0 µl DreamTaq Green PCR Master Mix; 1,5 µl mỗi xuôi rs17782313; 1,5 µl mỗi ngược rs17782313; 2,0 µl mẫu ADN. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR như sau: Khởi đầu 94°C trong 3 phút; tiếp theo 35 chu kỳ: biến tính 94°C trong 30 giây, gắn môi ở

50°C/52°C/54°C/56°C trong 30 giây, kéo dài 72°C trong 30 giây; kết thúc kéo dài 72°C trong 8 phút; giữ sản phẩm ở 15°C. Sản phẩm PCR (5 µl) được điện di trên thạch agarose 3%, nhuộm Redsafe-stained trong 40 phút ở 100 V, đệm 0,5X TBE. Hình ảnh điện di được chụp nhờ máy chụp ảnh Geldoc-It™ gel. Nhiệt độ gắn môi tốt nhất sẽ được chọn dựa vào kết quả thử nghiệm này.

- *Xác định độ đặc hiệu của phương pháp RFLP thiết kế:* Kết quả phân tích kiểu gen của phương pháp RFLP được kiểm tra lại bằng phương pháp giải trình tự gen. Ba mẫu với kiểu gen được xác định bằng phương pháp RFLP là CC (mẫu 192.105), CT (mẫu 101.126), TT (mẫu 102.138) được gửi đi giải trình tự gen theo chương trình SS1001, SS1002 của hãng Base Asia [17].

- *Phương pháp xử lý số liệu thống kê:* So sánh giữa các tỷ lệ bằng kiểm định χ^2 test, sử dụng phần mềm SPSS 16.0, giá trị $P < 0,05$ theo 2 phía được coi là có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Xây dựng quy trình PCR-RFLP để xác định kiểu gen MC4R-rs17782313

3.1.1. Kết quả lựa chọn enzyme cắt giới hạn và thiết kế môi cho phản ứng PCR

Cặp môi cho phản ứng PCR được chúng tôi thiết kế dựa trên phần mềm Oligo 7 Primer Analysis [14] là: môi xuôi 5'-ctagctctctccacatgc-3' và môi ngược: 5'-ctttctgtcatttcctc-3'. Sản phẩm PCR khi kiểm tra trên cơ sở dữ liệu genome [14] có 194 bp với trình tự: ctagctctctccacatgcatttggttaagacaagtcaagtggttactgatttaa gggcataagcaagttctacctaccatgttctggaagcaggaaaa ccagaatatatgtgagcatctttaatgactacaacattatagaagttt aaagcaggagagattgtatccYgagggaaatgacaagaaaag (Y là vị trí SNP rs17782313).

3.1.2. Kết quả lựa chọn nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho phản ứng PCR

Đề chọn được nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho phản ứng PCR, phương pháp PCR gradient được thực hiện, kết quả được thể hiện ở hình 1. Dựa vào kết quả hình ảnh điện di, chúng tôi

chọn nhiệt độ bắt mồi là 52°C. Do đó, chu trình nhiệt cho phản ứng PCR là: Khởi đầu 94°C trong 3 phút; tiếp theo 35 chu kỳ (biến tính 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở 52°C trong 30 giây, kéo dài 72°C trong 30 giây); tiếp tục kéo dài 72°C trong 8 phút; giữ sản phẩm ở 15°C.



Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR với các thang nhiệt độ gắn mồi khác nhau.

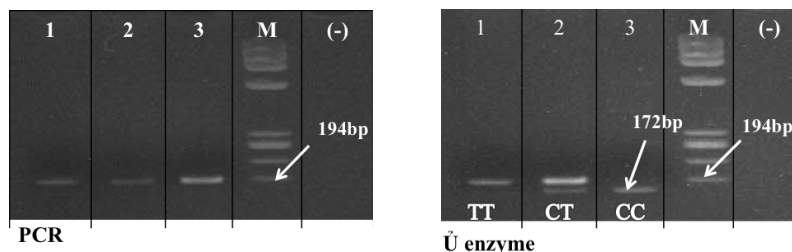
Ta: nhiệt độ gắn mồi, (-): mẫu H₂O, M: marker Φ X174 DNA *Hae*III Digest.

3.1.3. Kết quả kiểm tra hiệu quả cắt của enzyme cắt giới hạn *Ava*I để xác định kiểu gen *rs17782313*

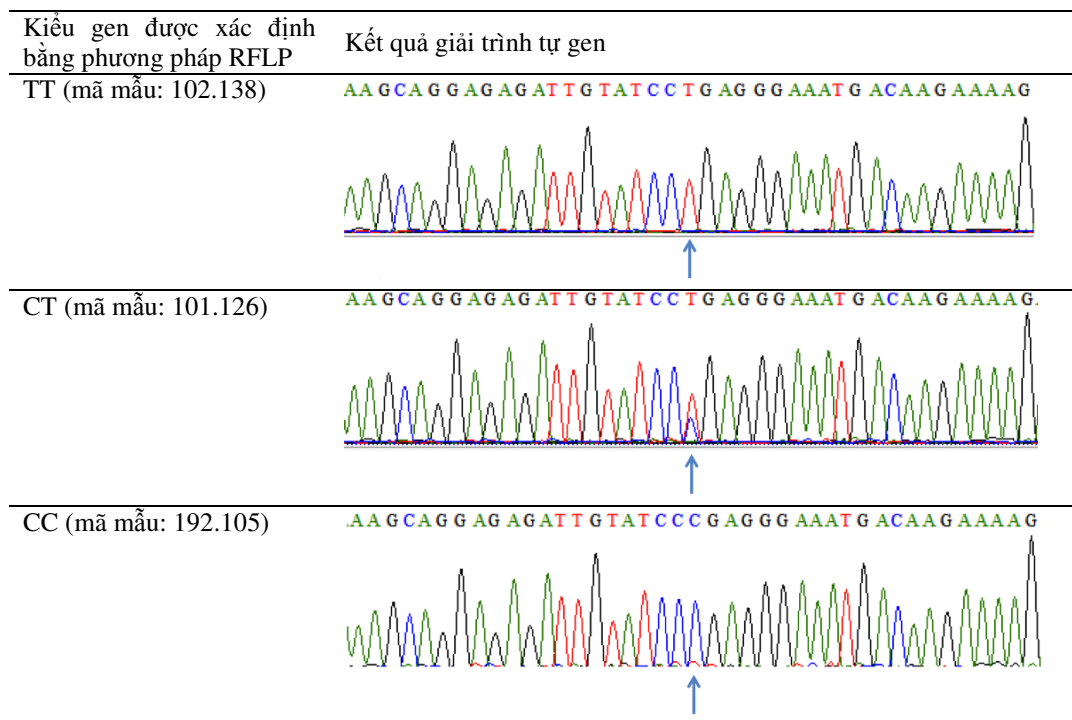
Ba mẫu ADN được chọn ngẫu nhiên để thực hiện PCR và ủ với enzyme *fastdigest Ava*I theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thành phần của 15 μ l thể tích cho một phản ứng ủ enzyme gồm: 8,5 μ l nước tinh khiết (không có ADN); 1,0 μ l 10X đệm sử dụng cho enzyme cắt nhanh; 0,5 μ l enzyme *fastdigest Ava*I và 5,0 μ l sản phẩm PCR (194bp). Điều kiện ủ ở 37°C trong 25 phút.

Các kiểu gen khác nhau của SNP *rs17782313* sẽ được nhận biết qua hình ảnh điện di sản phẩm ủ enzyme. Enzyme *Ava*I cắt

đoạn ADN mang alen C, mà không cắt ADN mang alen T, do đó, kiểu gen TT sẽ chỉ xuất hiện một băng duy nhất là 194 bp, kiểu gen CC sẽ xuất hiện 2 băng sản phẩm là 172 bp và 22 bp, kiểu gen CT sẽ cho sản phẩm 3 băng 194 bp, 172 bp và 22 bp. Hình 2 thể hiện kết quả hình ảnh điện di của sản phẩm PCR và kết quả ủ enzyme tương ứng của 3 mẫu với 3 kiểu gen khác nhau ở SNP *rs17782313* (CC, CT, TT). Ba mẫu với 3 kiểu gen khác nhau đã được xác định bằng phương pháp PCR-RFLP trên được gửi đi xác định lại bằng phương pháp giải trình tự gen. Kết quả cho thấy kiểu gen của SNP *rs17782313* được xác định bằng hai phương pháp này hoàn toàn trùng khớp (hình 3).



Hình 2. Hình ảnh điện di của sản phẩm PCR và ủ enzyme của 3 kiểu gen khác nhau ở SNP *rs17782313*. Kiểu gen TT (1 băng 194 bp), CT (2 băng 194 bp và 172 bp), CC (1 băng 172 bp). Số 1, 2, 3 chỉ các mẫu, M: marker Φ X174 DNA *Hae*III Digest, (-): mẫu H₂O.



Hình 3. Hình ảnh trình tự nucleotide của 3 kiểu gen được xác định lại bằng phương pháp giải trình tự gen. Mũi tên chỉ vị trí SNP rs17782313.

3.2. Đa hình nucleotide đơn MC4R-rs17782313 ở trẻ 5-6 tuổi Hà Nội bình thường và béo phì

Các mẫu ADN của 69 trẻ bình thường và 69 trẻ béo phì 5-6 tuổi (lấy ngẫu nhiên từ đề tài mã số: 01C-08/05-2011-2) được thực hiện phân tích kiểu gen SNP rs17782313 theo quy trình trên, kết quả cho tỷ lệ đọc là 100%. Sự phân bố đa hình nucleotide đơn ở các trẻ này được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ kiểu gen, tần số alen SNP rs17782313 ở trẻ 5-6 tuổi nhóm bình thường và nhóm béo phì

	Trẻ bình thường (1)	Trẻ béo phì (2)	$P_{1,2}$
Kiểu gen			
CC	3 (4,3%)	1 (1,4%)	
CT	9 (13,1%)	9 (13,1%)	
TT	57 (82,6%)	59 (85,5%)	
Tần số alen			
C	0,11	0,08	0,41
T	0,89	0,92	0
P_{HWE}	0,023	0,416	

HWE, Hardy-Weinberg equilibrium.

Giá trị P lấy từ Chi-square test

Kết quả cho thấy tỷ lệ kiểu gen ở nhóm béo phì tuân theo quy luật Hardy-Weinberg ($P=0,416$), còn ở nhóm bình thường lại không tuân theo quy luật Hardy-Weinberg ($P=0,023$). Tần số alen C ở nhóm bình thường là 0,11 ở nhóm béo phì là 0,08; tuy nhiên, không có sự khác biệt giữa tần số alen và tỷ lệ kiểu gen giữa hai nhóm này với $P=0,410$. Khi so sánh với tần số alen C của các quần thể khác trên thế giới trên cơ sở dữ liệu Hapmap, kết quả cho thấy tần số alen C ở nhóm đối tượng nghiên cứu của chúng tôi nhỏ hơn so với một số quần thể khác trên thế giới như quần thể người Hán ở Bắc Kinh (tần số alen C=0,193), quần thể người Nhật ở Tokyo (tần số alen C=0,27) [18].

4. Kết luận

Quy trình PCR-RFLP đã được thiết kế để xác định kiểu gen của SNP MC4R-rs17781313

với cặp môi sử dụng cho phản ứng PCR gồm: môi xuôi 5'-ctagtcttctccacatgc-3' và môi ngược 5'-cttttctgtcatttcctc-3'. Thành phần cho phản ứng PCR với tổng thể tích 15 µl gồm: 3,0 µl nước tinh khiết (không có ADN); 10,0 µl DreamTaq Green PCR Master Mix; 1,5 µl môi xuôi rs17782313; 1,5 µl môi ngược rs17782313; 2,0 µl mẫu ADN. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR là: Khởi đầu 94°C trong 3 phút; tiếp theo 35 chu kỳ: biến tính 94°C trong 30 giây, gắn môi ở 52°C trong 30 giây, kéo dài 72°C trong 30 giây; kết thúc kéo dài 72°C trong 8 phút; giữ sản phẩm ở 15°C. Năm µl sẽ được ủ với enzyme cắt giới hạn fastdigest *AvaI*, với thành phần phản ứng ủ enzyme gồm: 8,5 µl nước tinh khiết (không có ADN); 1,0 µl 10X đệm sử dụng cho enzyme cắt nhanh; 0,5 µl enzyme fastdigest *AvaI* và 5,0 µl sản phẩm PCR (194 bp). Điều kiện ủ là 37°C trong 25 phút. Sản phẩm ủ enzyme sẽ được điện di trên thạch agarose 3%, nhuộm Redsafe-stained trong 40 phút ở 100 V, đệm 0.5X TBE. Kiểu gen sẽ được nhận biết bởi sự xuất hiện các băng sản phẩm trên hình ảnh điện di: TT (1 băng 194 bp), CT (2 băng 194 bp và 172 bp), CC (1 băng 172 bp).

Tỷ lệ kiểu gen ở nhóm trẻ 5-6 tuổi có tình trạng dinh dưỡng bình thường tại Hà Nội là: CC (4,3%), CT (13,1%), TT (82,6%) ($P_{HWE}=0,023$), ở nhóm trẻ béo phì là: CC (1,4%), CT (13,1%), TT (85,5%) ($P_{HWE}=0,416$).

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được sự tài trợ của đề tài Sở Khoa học công nghệ Hà Nội mã số 01C-08/05-2011-2 và đề tài Bộ Giáo dục đào tạo mã số B2014-17-47.

Tài liệu tham khảo

- [1] Magenis RE, Smith L, Nadeau JH, et al., Mapping of the ACTH, MSH, and neural (MC3 and MC4) melanocortin receptors in the mouse and human. *Mamm Genome* 5 (8) (1994) 503.
- [2] Fan W, Boston BA, Kesterson RA, et al., Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385 (6612) (1997) 165.
- [3] Van der Ploeg LH, Martin WJ, Howard AD, et al., A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (17) (2002) 11381.
- [4] Farooqi IS, Rahilly S, Monogenic human obesity syndromes. *Recent Prog Horm Res* 59 (2004) 409.
- [5] Melania Manco, Bruno Dallapiccola, Genetics of Pediatric Obesity. *Pediatrics*; (2012) DOI: 10.1542/peds.2011-2717.
- [6] Beckers S, Zegers D, de Freitas F, et al., Association study of MC4R with complex obesity and replication of the rs17782313 association signal. *Mol Genet Metab* 103 (2011) 71.
- [7] Paternoster L, Evans DM, Nohr EA, et al., Genome-wide population-based association study of extremely overweight young adults - the GOYA study. *PLoS One* 6 (2011) e24303.
- [8] Qi L, Kraft P, Hunter DJ et al., The common obesity variant near MC4R gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change and diabetes risk in women. *Hum Mol Genet* 17(22) (2012) 3502.
- [9] Wang K, Li WD, Zhang CK, et al., 2011. A genome-wide association study on obesity and obesity-related traits. *PLoS One* 6: e18939.
- [10] Hoàng thị Huyền, Đỗ Thị Thanh Thủy, Nguyễn Thị Thu Tâm và cs, Ứng dụng kỹ thuật PCR-restriction fragment length polymorphism xác định đột biến gen SMN1 gây bệnh thoái hóa cơ tủy. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh* 16 (4) chuyên đề: điều dưỡng kỹ thuật y học (2012) 69.
- [11] Ncbi, 2013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6265 truy cập ngày 20/12/2013.
- [12] Helix, 2013. <http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html> truy cập ngày 20/12/2013.
- [13] Thermoscientificbio, 2013. <http://www.thermoscientificbio.com/> truy cập ngày 20/12/2013.
- [14] Oligo 7 softwave, 2013. <http://oligo.net/> truy cập ngày 20/12/2013
- [15] Genome, 2013. <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start> truy cập ngày 20/12/2013.
- [16] Restrictionmapper, 2013. <http://www.restrictionmapper.org/> truy cập ngày 20/12/2013.

- [17] Base Asia, 2015. http://www.base-asia.com/dna_sequencing/single_pass/ truy cập ngày 10/01/2015. 36&tmpl=snp_details_phase3 truy cập ngày 21/3/2015.
- [18] http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgiiperl/snp_details_phase3?name=rs6265&source=hapmap27_B

Preliminary Studies on Single Nucleotide Polymorphisms *MC4R* rs17782313 in Hanoi Children Aged 5-6 Years by PCR-RFLP Method

Lê Thị Tuyết¹, Trần Quang Bình²

¹Hanoi National University of Education, 136 Xuân Thủy, Hanoi, Vietnam

²National Institute of Hygiene and Epidemiology, 1 Yersin, Hanoi, Vietnam

Abstract: The melanocortin 4 receptor (*MC4R*) gene has an important role in food intake and metabolism regulation in human. Single nucleotide polymorphism (SNP) rs17782313, which locates near *MC4R* gene, affects the expression of the gene. This polymorphism (allele C) has been widely implicated in a host of several disorders like obesity and diabetes. The study aimed at applying the PCR-RFLP method for identifying the *MC4R* rs17782313 polymorphism in 138 Hanoi children aged 5-6 years (69 normal children, 69 obese children). We have designed the PCR-RFLP protocol to genotyping SNP rs17782313 with two PCR primers: forward 5'-ctagtctctctccacatgc-3' and reverse 5'-ctttctgtcatttcctc-3'. The *AvaI* restriction enzyme was selected to distinguish the C or T allele. The frequencies of the rs17782313 genotypes in normal group were: CC (4.3%), CT (13.1%), TT (82.6%) ($P_{HWE}=0.023$), and in obese group were: CC (1.4%), CT (13.1%), TT (85.5%) ($iP_{HWE}=0.416$).

Keywords: Children, genotyping, *MC4R* rs17782313, PCR-RFLP.